

Vergleich zwischen der Svedberg-, der Maximalgradienten- und der Drei-Punkte-Methode zur Auswertung der mit Philpot-Svensson-Optik gewonnenen Kurven der Ultrazentrifuge

Von M. GEHATIA und L. HÜBNER

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt a. M.
(Vorm. Direktor: Prof. Dr. K. FELIX)

und
aus dem Chemotherapeutischen Forschungsinstitut „Georg-Speyer-Haus“
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. R. PRIGGE)

(Z. Naturforsch. 15 b, 351—364 [1960]; eingegangen am 28. Dezember 1959)

Rinderplasma-Albumin wurde bei seinem isoelektrischen Punkt gelöst und in einer Unterschichtungszelle ultrazentrifugiert. Die mit Philpot-Svensson-Optik und Phasenplatte gewonnenen Sedimentationskurven wurden nach der Svedberg-Methode¹ (Sv.M.), nach der Maximalgradienten-Methode² (Mg.M.) und nach der Drei-Punkte-Methode² (D.P.M.) ausgewertet.

Die klassische Svedberg-Methode liefert die Sedimentationskonstante s ; mit den beiden neuen Methoden kann man auf einfache Weise unmittelbar den Quotienten s/D sowie gleichzeitig und aus denselben Meßgrößen die Sedimentationskonstante s und die Diffusionskonstante D erhalten. (Die Bestimmung des zweiten Momentes der Sedimentationskurve, wie bei der Archibald-Methode³ ist dabei nicht erforderlich.)

Nach Sv.M. und Mg.M. ergab sich der gleiche Wert für die Sedimentationskonstante. Nach der D.P.M. wurde eine um etwa 11% größere Sedimentationskonstante erhalten. Diese Abweichung beruht vermutlich auf einem bei der D.P.M. leicht unterlaufenden systematischen Meßfehler.

Der mittlere Fehler der nach Svedberg bestimmten Sedimentationskonstante betrug $\pm 2,7\%$. Etwa sechsmal größer war der mittlere Fehler von s und s/D bei der Mg.M., nämlich $\pm 17\%$, trotz annähernd gleicher Meßgenauigkeit bei Sv.M. und Mg.M.

Es scheint, daß die neuen Methoden schärfere und eindeutiger Sedimentations-Kurven erfordern als sie mit dem Philpot-Svensson-System bisher im allgemeinen erhalten werden können.

Eine Ausnahme macht dabei die nach der Mg.M. bestimmte Diffusionskonstante D , deren mittlerer Fehler hier 1,2% betrug.

Aus der mathematischen Analyse des Sedimentations-Vorganges in der Ultrazentrifuge wurden neue Methoden abgeleitet, nach denen man die zur Berechnung des Molekulargewichts nötigen Konstanten s und D und unmittelbar den Quotienten s/D aus den experimentellen Kurven der Ultrazentrifuge bestimmen kann². Die praktische Durchführung dieser Methoden soll hier an Albumin als Beispiel gezeigt werden.

Der Versuch wurde mit der luftgetriebenen und mit einer Phasenplatte ausgerüsteten Phywe-Ultrazentrifuge in einer Unterschichtungszelle durchgeführt. Aus den gewonnenen Gradientenkurven der Philpot-Svensson-Optik wurden die Konstanten s und D nach den neuen Methoden ermittelt und zum Vergleich außerdem die Sedimentationskonstante s nach der üblichen Svedberg-Methode bestimmt¹.

I. Theoretische Grundlagen

Svedberg-Methode (Sv.M.)

Die Bestimmung der Sedimentationskonstante s nach Svedberg beruht auf der bekannten Gleichung¹:

$$\beta t = \ln r_{\max} - \ln r_0 \quad (1)$$

bzw.

$$\log r_{\max} = 0,4343 s \omega^2 t + \log r_0,$$

wobei r_{\max} = Abstand des maximalen Brechungsindex-Gradienten vom Rotationszentrum.

Maximalgradienten-Methode (Mg.M.) und Drei-Punkte-Methode (D.P.M.)

Aus der mathematischen Analyse des Sedimentations-Vorganges in der Ultrazentrifuge² ergibt sich:

Wenn eine ideale Lösung eines einheitlichen, ungeladenen (bzw. beim isoelektrischen Punkt befindlichen) Hochpolymeren bei konstanter Temperatur in einer Unterschichtungszelle mit konstanter Winkelgeschwindigkeit ω rotiert, und die Schichtgrenze weder durch

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

¹ T. Svedberg u. K. O. Pedersen, Die Ultrazentrifuge, Verlag von Theodor Steinkopff, Dresden und Leipzig 1939.

² M. Gehatia, Kolloid-Z. 167, 1 [1959].

³ W. J. Archibald, J. phys. Colloid Chem. 51, 1204 [1947].

den Meniskus noch durch den Zellboden gestört wird, dann kann man die Änderung der optischen Dichte in der Schichtgrenze längs der Zelle, die Brechungsindex-Gradienten dn/dr , bei den Abständen r vom Rotationszentrum zur Versuchszeit t mit folgender Gleichung angeben:

$$\left(\frac{dn}{dr}\right) = \frac{\Delta n_0 e^{-\beta t} r_0}{2 D \alpha t} \exp. \left\{ -\frac{(r_0^2 e^{2\beta t} + r^2)}{4 D \alpha t} \right\} I_1 \left(\frac{2 r r_0 e^{\beta t}}{4 D \alpha t} \right) \quad (2)$$

Hierbei ist:

Δn_0 = Unterschied zwischen dem Brechungsindex des Lösungsmittels und dem Brechungsindex der unterschichteten Lösung zu Beginn des Versuchs.

r_0 = Abstand der Schichtgrenze vom Rotationszentrum zur Versuchszeit $t=0$.

D = Diffusionskonstante des gelösten Stoffes.

β = $\omega^2 s$ (s =Sedimentationskonstante des gelösten Stoffes).

α = $(e^{2\beta t} - 1)/(2 \beta t)$.

$I_1(2x) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{x^{2k+1}}{k!(k+1)!}$ (Komplexe Bessel-Funktion Ordnung 1)

Für nicht allzu kleine Molekeln und nicht zu lange Versuchsdauer kann man Gl. (2) durch die Näherungsgl. (3) ersetzen:

$$\left(\frac{dn}{dr}\right) = \frac{\Delta n_0 e^{-2\beta t}}{(4 \pi D \alpha t)^{1/2}} \exp. \left\{ \frac{(r_0 e^{\beta t} - r)^2}{4 D \alpha t} \right\} \left(\frac{r_0 e^{\beta t}}{r} \right)^{1/2} \quad (3)$$

Aus der Gl. (3) wurde die Maximalgradienten-Methode (Mg.M.) und die Drei-Punkte-Methode (D.P.M.) abgeleitet, die die Bestimmung der Konstanten s und D sowie unmittelbar der Größe s/D aus den experimentellen Gradientenkurven-Aufnahmen der Ultrazentrifuge ermöglichen:

Mg.M.

Da der Abstand r des maximalen Brechungsindex-Gradienten $(dn/dr)_{\max} = H$ vom Rotationszentrum unter den üblichen Umständen fast gleich $r_0 e^{\beta t}$ ist², ergibt sich aus Gl. (3) für $(dn/dr)_{\max} = H$ der Ausdruck:

$$\left(\frac{dn}{dr}\right)_{\max} = H \approx \frac{\Delta n_0 e^{-2\beta t}}{(4 \pi D \alpha t)^{1/2}} \quad (\beta = \omega^2 s) \quad (4)$$

Daraus folgen die beiden Funktionen h und g^2 , die die Beziehung zwischen dem aus der experimentellen Gradientenkurve feststellbaren Maximalgradienten H bei der Versuchszeit t und den gesuchten Konstanten s und D darstellen:

$$h = \frac{4 \pi}{(\Delta n_0)^2} H^2 = \text{const} \cdot H^2 = \frac{1}{D} \frac{1}{t} - 5 \omega^2 \frac{s}{D}, \quad (5)$$

$$g = \frac{4 \pi}{(\Delta n_0)^2} H^2 t = \text{const} \cdot H^2 t = \frac{1}{D} - 5 \omega^2 \frac{s}{D} t.$$

h - und g -Funktion sind Geraden mit $\text{const} \cdot H^2$ bzw. $\text{const} \cdot H^2 t$ als Ordinate und $1/t$ bzw. t als Abszisse.

Aus der Neigung der h -Gerade ist D und aus ihrem Ordinatenabschnitt bei $1/t=0$ (d. h. $t=\infty$) ist s/D zu

errechnen. Aus der Steigung der g -Gerade ist s/D und aus ihrem Ordinatenabschnitt bei $t=0$ ist D zu errechnen.

D.P.M.

Aus Gl. (3) lassen sich folgende Ausdrücke für s/D und s ableiten:

$$\frac{s}{D} \omega^2 = 2 \left[\frac{g_{2:1}(r_3 + r_2 - 2r_0) - g_{3:2}(r_2 + r_1 - 2r_0)}{r_0(r_3 - r_1)} \right], \quad (6)$$

$$e^{s\omega^2 t} = \frac{g_{2:1}(r_3 + r_2) - g_{3:2}(r_2 + r_1)}{2r_0(g_{2:1} - g_{3:2})}, \quad (7)$$

wobei bedeutet:

$$g_{2:1} = \frac{\ln[(r_2)^{1/2}(dn/dr)_2 / (r_1)^{1/2}(dn/dr)_1]}{(r_2 - r_1)},$$

$$g_{3:2} = \frac{\ln[(r_3)^{1/2}(dn/dr)_3 / (r_2)^{1/2}(dn/dr)_2]}{(r_3 - r_2)}.$$

Die Indexpunkte 1, 2 und 3 beziehen sich auf drei beliebige, nicht weit auseinander liegende Punkte auf der experimentellen Gradientenkurve zur selben Zeit t .

Mittels dieser drei Punkte kann man die Konstanten s und s/D errechnen, indem man die diesen drei Punkten in der Zelle entsprechenden Abstände r_1 , r_2 und r_3 vom Rotationszentrum und die Gradienten $(dn/dr)_1$, $(dn/dr)_2$ und $(dn/dr)_3$ durch Ausmessen der Gradientenkurve feststellt.

II. Durchführung des Versuches

Rinderplasma-Albumin (Crystallized Bovin-Plasma-Albumin, Armour's Lot. No. 67 808) wurde drei Monate vor dem Versuch in einer Konzentration von 0,56 g/100 ml in Essigsäure-Natriumacetat-Puffer mit Natriumchlorid (0,03-m. Essigsäure, 0,02-m. Natriumacetat, 0,15-m. Natriumchlorid, p_H 4,4) gelöst. Die optischen Dichten der Lösung und des Lösungsmittels wurden mit dem Abbe-Refraktometer bei etwa 21 °C gemessen. Die Differenz, Δn_0 , ergab sich zu $9,5 \cdot 10^{-4}$.

Der Versuch wurde mit der luftgetriebenen Phywe-Ultrazentrifuge mit Philipot-Svensson-Optik und Phasenplatte durchgeführt. Eine 1,2 cm dicke, 4° winkelige, sektorförmige Unterschichtungszelle wurde benutzt, deren obere Kante vom Rotationszentrum einen Abstand von 6,07 cm hat.

Es wurde eine Rotorgeschwindigkeit von 29 400 UpM angewandt. Bei etwa 3000 UpM fand die Unterschichtung des Lösungsmittels mit der Lösung statt. Für die Beschleunigung von 0 auf 29 400 UpM wurden bei konstantem Druck der Treibluft 270 Sek. benötigt. Ein Drittel hiervon = 90 Sek. wurde als die „wahre“ Sedimentationszeit t angenommen.

Von der Sedimentierung wurden insgesamt 32 Aufnahmen der Gradientenkurve innerhalb von rund 90 Min. im Abstand von etwa 3 Min. mit einer Belichtung von 15 und 30 Sek. gemacht (Abb. 1).

Die Rotortemperatur schwankte während des Versuches zwischen 20,8 und 21,2 °C.

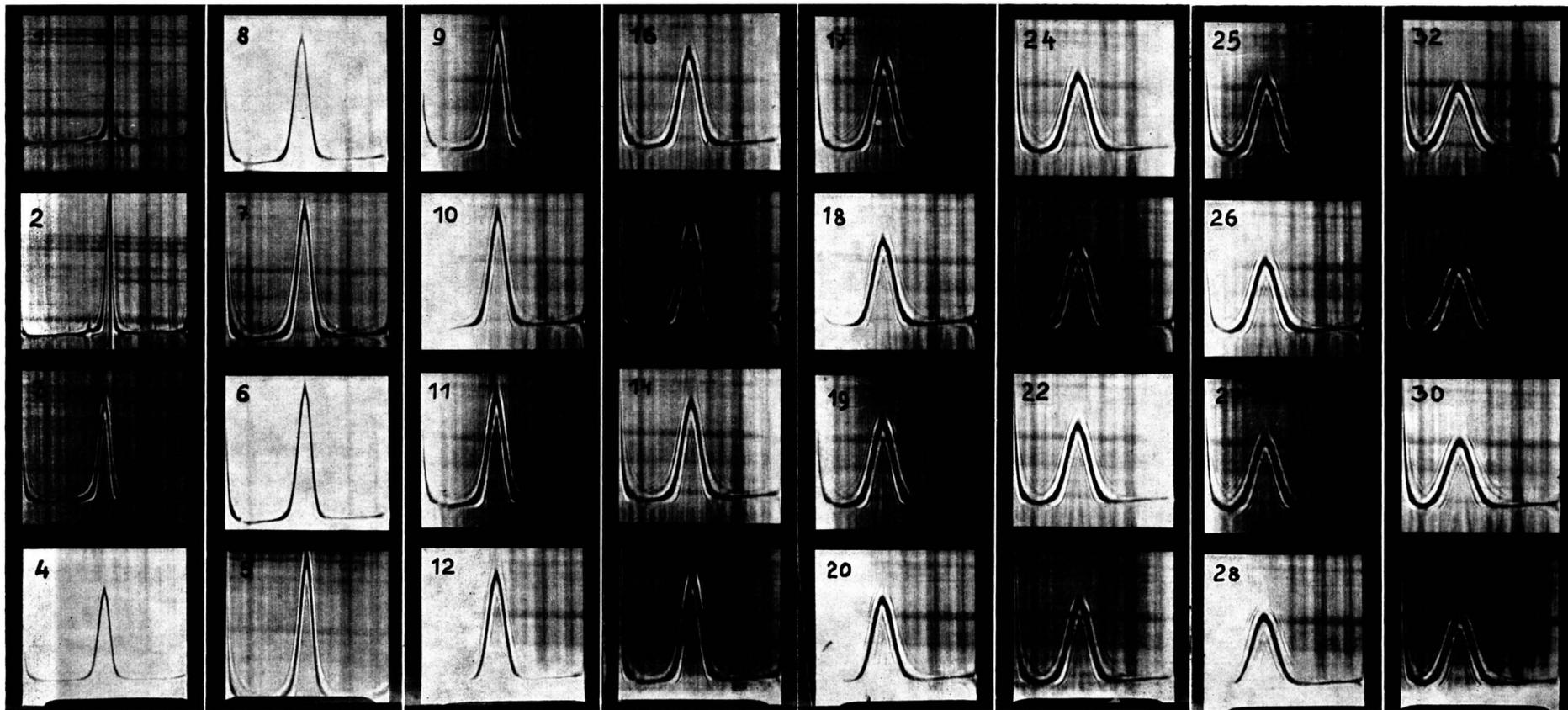


Abb. 1. Gradientenkurven-Aufnahmen. Rinderplasma-Albumin 0,56 g/100 ml in Essigsäure-Natriumacetat-Puffer mit Natriumchlorid, pH 4,4. Unterschichtungszelle. 29 400 UpM, 21 °C. *Philpot*-Winkel: Aufnahmen 1–4: 30°, Aufnahmen 8–32: 45°. (Bei den ungerade numerierten Aufnahmen wurde 15, bei den gerade numerierten wurde 30 Sek. belichtet.) Sedimentationsrichtung von rechts nach links.

III. Die Auswertung der Gradientenkurven-Aufnahmen

Es sollten im allgemeinen nicht allzu frühe Aufnahmen der Gradientenkurve ausgewertet werden.

Bei der Unterschichtung vermischen sich die Grenzschichten der beiden Flüssigkeiten etwas. Die Unterschichtung findet schon bei 3000 UpM statt. Während der anschließenden starken Beschleunigung bis zur gewünschten konstanten Geschwindigkeit weichen die Gradienten von den Ausdrücken der Gl. (2) und (3) stark ab. Mit wachsender Versuchsdauer fallen diese Anfangsfehler immer weniger ins Gewicht. Deswegen sollten etwas spätere Aufnahmen bei der Auswertung bevorzugt werden, wenn auch die Annäherungsgl. (3) an sich nur für $t=0$ als Interpolationsformel der exakten Gl. (2) abgeleitet wurde.

Das Ausmessen der Gradientenkurven-Aufnahmen erfolgte hier auf einfachste Weise, nämlich mit einem transparenten Lineal, wobei die hundertstel cm noch geschätzt wurden. Zum Ausmessen wurden drei- und zehnfache photographische Vergrößerungen der Aufnahmen hergestellt.

Die benutzten Apparatekonstanten und Vergrößerungsfaktoren

Sv.M. (Tab. 1)

Für die Bestimmung der Sedimentationskonstante s nach Svedberg nach Gl. (1) benötigt man die Abstände r_{\max} des maximalen Brechungsindex-Gradienten in der Zelle vom Rotationszentrum. Es war hier:

$$r_{\max} = r'_{\max}/G + 6,070 \text{ cm} \quad (8)$$

6,070 cm = Abstand „obere“ Zellenkante vom Rotationszentrum;

r'_{\max} = Abstände vom Maximum der photographierten Gradientenkurve bis zum Bild der „oberen“ Zellenkante.

Diese Abstände wurden auf den Photos in cm ausgemessen (Tab. 1).

$G=6,12$ ist die radiale Vergrößerung der Gradientenkurve. (G gibt an, wieviel mal die Aufnahme der Gradientenkurve in radialer Richtung, das ist in r' -Richtung, größer ist als der entsprechende wirkliche Abstand in der Zelle.)

Mg.M. (Tab. 1)

Für die Maximalgradienten-Methode benötigt man nach Gl. (5) die maximalen Brechungsindex-Gradienten $H = (dn/dr)_{\max}$.

Es war hier:

$$H = \left(\frac{dn}{dr} \right)_{\max} = \frac{Z'_{\max}}{F l a \operatorname{tg} \varphi} \quad (9)$$

$l=94,5 \text{ cm}$ = „Optischer Hebel“, d. h. optischer Weg: Zellenmitte-Phasenplatte;

$a=1,2 \text{ cm}$ = Zelldicke;

$\varphi=45^\circ$ = „Philpot-Winkel“, d. h. Neigung der Phasenplatte;

Z'_{\max} = Längen der maximalen Ordinate der photographierten Gradientenkurve. Diese Längen wurden auf den Photos in cm ausgemessen (Tab. 1);

$F=5,61$ = ist die Vergrößerung der Gradientenkurve entlang der Gradienten-Koordinate, d. h. in Richtung der Ordinate Z' . (F gibt an, wieviel mal die Ordinate Z' der Gradientenkurve bei $\operatorname{tg} 45^\circ=1$ größer sind als die entsprechenden wirklichen Strecken $(dn/dr) l a$ auf der Phasenplatte, um die das Spaltbild dort – infolge (dn/dr) in der Zelle – abgelenkt wird.)

Bei der Svedberg-Methode wird die photographierte Gradientenkurve also in radialer Richtung (Abstände r'_{\max} vom Maximum bis zum Bild der „oberen“ Zellenkante), bei der Maximalgradienten-Methode senkrecht dazu (Längen Z'_{\max} der maximalen Ordinate) vermessen. Darum ist im ersten Falle der radiale Vergrößerungsfaktor G und im anderen der Vergrößerungsfaktor F längs der Gradienten-Koordinate erforderlich, um aus den gemessenen Größen die wahren Größen zu berechnen. Bei der Drei-Punkte-Methode muß die Gradientenkurve sowohl in radialer Richtung (Abstände r'_1 , r'_2 und r'_3 von drei Punkten auf der Kurve bis zum Bild der „oberen“ Zellenkante) als auch senkrecht dazu (Längen Z_1 , Z_2 und Z_3 der Ordinate dieser drei Punkte) vermessen werden.

D.P.M.

Da in den Gl. (6) und (7) die Gradienten dn/dr nur paarweise als Quotienten auftreten, kann man sie dort in jedem beliebigen Maß einsetzen und braucht die gemessenen Z_1 , Z_2 und Z_3 nicht erst nach Gl. (9) in die Gradienten dn/dr umzurechnen. Darum ist für die D.P.M. nur der radiale Vergrößerungsfaktor G notwendig, um aus den gemessenen r'_1 , r'_2 und r'_3 die wahren r nach Gl. (8) zu erhalten.

Nach der D.P.M. wurden hier zwei Gradientenkurven-Aufnahmen mit $G=18,16$ (Nr. 13 u. Nr. 14) und zwei Aufnahmen mit $G=19,85$ (Nr. 16 u. Nr. 31) ausgewertet, also etwa dreimal größere Kurven als bei der Sv.M.

Die Bestimmung der Vergrößerungsfaktoren G und F

Zur Bestimmung des radialen Vergrößerungsfaktors G wurde anstatt der Unterschichtungszelle eine „Einstellzelle“ bei stehendem Rotor, Plattenhalterstellung 1,6 und eingeschalteten Zylinderlinsen fotografiert. Die Einstellzelle war mit dem beim Versuch benutzten Puffer gefüllt und enthielt eine Skala mit Strichabständen von je 0,02 cm.

Die Skalenaufnahme wurde photographisch noch weiter vergrößert und die Länge von 50 Strichabständen in cm ausgemessen. Diese Länge ist G , da 50 Strichabstände in Wahrheit = 1 cm.

Zur Bestimmung von F , der Vergrößerung längs der Gradienten-Koordinate, wurde dieselbe Skala an der Stelle der Phasenplatte, mit den Skalenstrichen senkrecht zum Spaltbild angebracht und mittels der Zylinderlinsen bei Plattenhalterstellung 1,6 fotografiert. Auf der noch weiter photographisch

		s nach Svedberg					Maximalgradienten-Methode						
		$\log r_{\max} = 0,4343 \omega^2 s t + \log r_0$					$Z^2_{\max} = \frac{1}{KD} \frac{1}{t} - \frac{5\omega^2 s}{KD}$ (h -Funktion)						
		$G = 6,12$					$Z^2_{\max} t = \frac{1}{KD} - \frac{5\omega^2 s}{KD} t$ (g -Funktion)						
		$K = \frac{4\pi}{(\Delta n_0 F \cdot l \cdot a)^2} = \frac{4\pi}{(9,5 \cdot 10^{-4} \cdot 5,61 \cdot 94,5 \cdot 1,2)^2} = 34,404$								h -Funktion		g -Funktion	
Aufnahme Nr.	t [sek]	r'_{\max} [cm]	r'_{\max}/G	$r_{\max} = 6,070$ [cm]	$\log r_{\max}$	t [sek]	Z'_{\max} [cm]	$Z'_{\max}/\text{tg } \varphi$ [cm]	Z^2_{\max}	$1/t$ [sek ⁻¹]	$Z^2_{\max} t$	t [sek]	
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	$\cdot 10^4$	$\cdot 10^{-4}$	—	
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
3	840	3,35	0,547	6,617	0,82066	840	4,20	7,27	52,85	11,905	4,439	840	
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
5	1200	3,49	0,570	6,640	0,82217	1200	—	für	—	—	—	—	
6	—	—	—	—	—	—	—	tg 45° = 1	—	—	—	—	
7	1440	3,53	0,577	6,647	0,82263	1440	5,40	ist	29,16	6,944	4,199	1440	
8	—	—	—	—	—	—	—	$Z = Z'$	—	—	—	—	
9	1860	3,53	0,577	6,647	0,82263	1860	4,65	→	21,62	5,376	4,021	1860	
10	1920	3,54	0,578	6,648	0,82269	1920	4,70	—	22,09	5,208	4,241	1920	
11	2100	3,55	0,580	6,650	0,82282	2100	4,52	—	20,43	4,762	4,290	2100	
12	2170	3,60	0,588	6,658	0,82334	2170	—	—	—	—	—	—	
13	2340	3,69	0,603	6,673	0,82432	2340	4,20	—	17,64	4,274	4,128	2340	
14	2520	3,73	0,609	6,679	0,82471	2520	4,10	—	16,81	3,968	4,236	2520	
15	2640	3,73	0,609	6,679	0,82471	2640	3,90	—	15,21	3,788	4,015	2640	
16	2820	3,78	0,618	6,688	0,82530	2820	3,85	—	14,82	3,546	4,179	2820	
17	3120	3,78	0,618	6,688	0,82530	3120	3,58	—	12,82	3,205	4,000	3120	
18	3240	3,80	0,621	6,691	0,82549	3240	3,55	—	12,60	3,086	4,082	3240	
19	3440	3,84	0,627	6,697	0,82588	3440	3,43	—	11,76	2,907	4,045	3440	
20	3540	3,89	0,636	6,706	0,82646	3540	—	—	—	—	—	—	
21	3720	3,97	0,649	6,719	0,82730	3720	3,30	—	10,89	2,688	4,051	3720	
22	3860	4,00	0,654	6,724	0,82763	3860	3,30	—	10,89	2,591	4,204	3860	
23	4020	4,00	0,654	6,724	0,82763	4020	3,15	—	9,92	2,488	3,988	4020	
24	4140	4,02	0,657	6,727	0,82782	4140	3,11	—	9,67	2,415	4,003	4140	
25	4380	4,03	0,658	6,728	0,82789	4380	2,97	—	8,82	2,283	3,863	4380	
26	4510	4,03	0,658	6,728	0,82789	4510	2,97	—	8,82	2,217	3,978	4510	
27	4680	4,05	0,662	6,732	0,82814	4680	2,85	—	8,12	2,137	3,800	4680	
28	4870	4,11	0,672	6,742	0,82879	4870	—	—	—	—	—	—	
29	5040	4,15	0,678	6,748	0,82918	5040	2,73	—	7,45	1,984	3,755	5040	
30	5220	4,20	0,686	6,756	0,82969	5220	2,73	—	7,45	1,916	3,889	5220	
31	5400	4,20	0,686	6,756	0,82969	5400	2,65	—	7,02	1,852	3,791	5400	
32	5580	4,25	0,694	6,764	0,83020	5580	2,62	—	6,86	1,792	3,828	5580	

Tab. 1. Auswertung der Gradientenkurven nach der Svedberg- und der Maximalgradienten-Methode.

vergrößerten Skalenaufnahme wurde die Länge von 30 Strichabständen in cm ausgemessen. Diese Länge geteilt durch 0,6 ist F , da 30 Strichabstände in Wahrheit $30 \cdot 0,02 = 0,6$ cm.

Die Gradientenkurven des Versuches wurden bei derselben Plattenhalterstellung wie die Skala aufgenommen und anschließend auch bei derselben Einstellung des Vergrößerungsapparates wie die Skalenaufnahmen photographisch weiter vergrößert. Daher galten die mittels der Skalenaufnahmen festgestellten Vergrößerungsfaktoren G und F auch für die Aufnahmen der Gradientenkurven.

Die Auswertung nach der Svedberg-Methode (Tab. 1, Abb. 2)

Die Abstände r_{\max} wurden nach Gl. (8) aus den gemessenen r'_{\max} errechnet (Tab. 1) und ihre Logarithmen gegen die „wahre“ Versuchszeit t aufgetragen (Abb. 2). Gemäß Gl. (1) sollen die gezeichneten Punkte auf einer Geraden liegen, aus deren Steigung $\Delta \log r_{\max} / \Delta t = 0,4343 \omega^2 s$, die Sedimentationskonstante s und aus deren Ordinatenabschnitt bei $t=0$, $\log r_{\max} = \log r_0$, der Abstand r_0 der Schichtgrenze vom Rotationszentrum zur Versuchszeit $t=0$ einfach zu berechnen ist.

Als Gerade, die den gezeichneten experimentellen Punkten am besten angepaßt ist, wurde die angesehen, die man mittels Ausgleich nach der Methode der kleinsten Quadrate erhält. Die Rechnung lieferte für s und r_0 :

$$s = 4,75 \cdot 10^{-13} \pm 0,13 \cdot 10^{-13} \text{ sec } (\pm 2,7\%),$$

$$r_0 = 6,598 \text{ cm.}$$

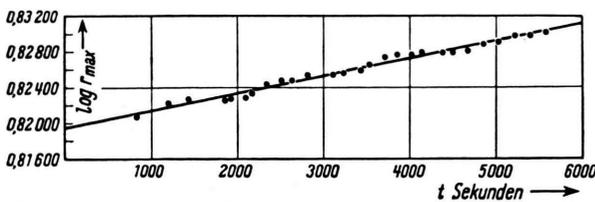


Abb. 2. s nach Svedberg.

$$\log r_{\max} = 0,4343 \omega^2 s t + \log r_0$$

$$\omega^2 = 9,479 \cdot 10^6$$

$$0,4343 \omega^2 s = \frac{\Delta \log r_{\max}}{\Delta t} = 1,954 \cdot 10^{-6}$$

(Steigung)

$$s = 4,75 \cdot 10^{-13}$$

$$\log r_0 = \log r_{\max} \text{ für } t=0 = 0,81941$$

(Ordinatenabschnitt)

$$r_0 = 6,598$$

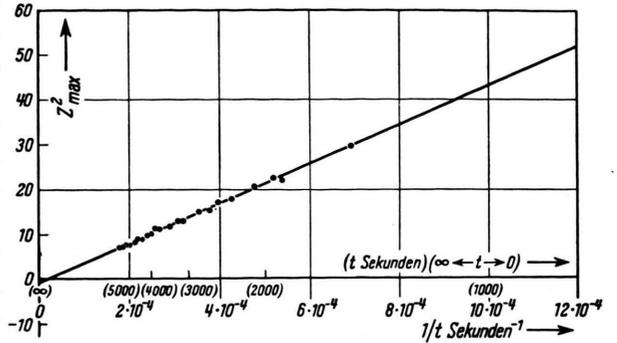


Abb. 3. Maximalgradienten-Methode (h -Funktion).

$$Z_{\max}^2 = \frac{1}{K D} \frac{1}{t} - \frac{5 \omega^2 s}{K D}$$

$$\omega^2 = 9,479 \cdot 10^6, K = 34,404,$$

$$\frac{1}{K D} = \frac{\Delta Z_{\max}^2}{\Delta 1/t} = 4,375 \cdot 10^4$$

(Steigung)

$$D = 6,64 \cdot 10^{-7}$$

$$-\frac{5 \omega^2 s}{K D} = Z_{\max}^2 \text{ für } 1/t=0 = -0,983$$

(Ordinatenabschnitt)

$$\frac{s}{D} = 7,14 \cdot 10^{-7}$$

$$5 \omega^2 s = 1/t \text{ für } Z_{\max}^2=0 = 0,225 \cdot 10^{-4}$$

(Abszissenabschnitt)

$$s = 4,74 \cdot 10^{-13}$$

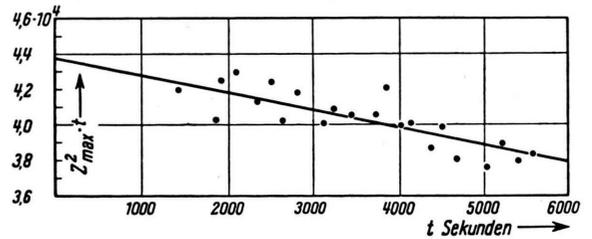


Abb. 4. Maximalgradienten-Methode (g -Funktion).

$$Z_{\max}^2 t = \frac{1}{K D} - \frac{5 \omega^2 s}{K D} t$$

$$\omega^2 = 9,479 \cdot 10^6, K = 34,404,$$

$$\frac{1}{K D} = (Z_{\max}^2 t) \text{ für } t=0 = 4,375 \cdot 10^4$$

(Ordinatenabschnitt)

$$-\frac{5 \omega^2 s}{K D} = \frac{\Delta (Z_{\max}^2 t)}{\Delta t} = -0,983$$

(Steigung)

Die Auswertung nach der
Maximalgradienten-Methode
(Tab. 1; Abb. 3 und 4)

Gl. (9) eingesetzt in Gl. (5) ergibt:

$$Z_{\max}^2 = \frac{1}{K D} \frac{1}{t} - \frac{5 \omega^2 s}{K D} \quad (h\text{-Funktion}), \quad (10)$$

$$Z_{\max}^2 t = \frac{1}{K D} - \frac{5 \omega^2 s}{K D} t \quad (g\text{-Funktion}), \quad (11)$$

wobei

$$K = \frac{4 \pi}{(\Delta n_0 F l a)^2}$$

und $Z_{\max} = Z'_{\max} / \operatorname{tg} \varphi$.

Z'_{\max} ist die auf jeder Gradientenkurven-Aufnahme in cm ausgemessene Länge der maximalen Ordinate und wird dividiert durch $\operatorname{tg} \varphi$, den tg des „Philpot-Winkels“, der bei der betreffenden Aufnahme eingestellt war. (Falls alle Gradientenkurven-Aufnahmen eines Versuches bei demselben Philpot-Winkel gemacht wurden, wird $\operatorname{tg} \varphi$ mit in die Konstante K hineingenommen und statt Z_{\max} steht dann in Gl. (10) und (11) Z'_{\max} .)

In dem hier beschriebenen Versuch war φ stets 45° d. h. $\operatorname{tg} \varphi = 1$ und infolgedessen $Z'_{\max} = Z_{\max}$ (Tab. 1). Die Z'_{\max} wurden gemessen von der inneren Trennlinie der Kurve zwischen Dunkel und Hell bis zur Basislinie. Die Basislinie wurde als Verlängerung des unteren Randes der nichtabgelenkten Phasengrenze gezeichnet. Die aus den gemessenen Z_{\max} berechneten Z_{\max}^2 wurden gegen die reziproke „wahre“ Versuchszeit $1/t$ aufgetragen (h -Funktion) und die berechneten $Z_{\max}^2 t$ gegen die „wahre“ Versuchszeit t (g -Funktion) (Abb. 3 und 4). Gemäß Gl. (10) und (11) sollen die gezeichneten Punkte auf Geraden liegen, so daß:

$$\frac{1}{K D} = \text{Steigung von } h = \text{Ordinatenabschnitt von } g$$

$$\frac{5 \omega^2 s}{K D} = \text{Steigung von } g = \text{Ordinatenabschnitt von } h$$

$$5 \omega^2 s = \frac{\text{Ordinatenabschn. von } h}{\text{Steigung}} = \frac{\text{Steigung}}{\text{Ordinatenabschn.}} \text{ von } g.$$

(Die Ordinatenabschnitte, die man durch Extrapolation der durch die experimentellen Punkte gelegten h -Gerade nach $1/t = 0$, d. h. $t = \infty$, und der g -Gerade nach $t = 0$ erhält, haben zwar die angegebene mathematische, aber keine reale physikalische Bedeutung,

denn Z_{\max}^2 kann zur Zeit $t = \infty$ nicht negativ, sondern nur null werden.)

Aus Steigung und Ordinatenabschnitt der Gerade h oder g ist also mit Hilfe der Konstante K sowohl D als auch s/D einfach zu berechnen. Hier war $K = (4 \pi) / (0,00095 \cdot 5,61 \cdot 94,5 \cdot 1,2)^2 = 34,404$ (Abb. 3 und 4). Für die Berechnung von s wird, wie oben ersichtlich, die Konstante K , die u. a. den Vergrößerungsfaktor F enthält, nicht gebraucht, sondern s ergibt sich einfach aus dem Verhältnis von Ordinatenabschnitt zu Steigung bzw. von Steigung zu Ordinatenabschnitt der Gerade h bzw. g , d. h. aus den Abszissenabschnitten. Die Sedimentationskonstante s kann also nach der Mg.M. direkt, ohne daß man erst einen Vergrößerungsfaktor ermitteln müßte, aus den gemessenen maximalen Ordinaten Z_{\max} der photographierten Gradientenkurve bestimmt werden.

Als die den gezeichneten Punkten, Z_{\max}^2 gegen $1/t$ und $Z_{\max}^2 t$ gegen t , am besten angepaßten Geraden wurden – wie bei der Sv.M. – wieder die betrachtet, die man mittels Ausgleich nach der Methode der kleinsten Quadrate erhält. Bei dem Ausgleich mußten aber hier den Größen Z_{\max}^2 und $Z_{\max}^2 t$ „Gewichte“ zuerteilt werden. Führt man die Ausgleichungen ohne Gewichte durch, so bekommt man hier aus h - und g -Funktion unterschiedliche Werte für $1/(K D)$, $(5 \omega^2 s)/(K D)$ und $5 \omega^2 s$.

Nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz hat die Größe Z_{\max}^2 den mittleren Fehler $m(Z^2) = 2 \mathfrak{B}_{\max} \cdot m(Z)$ und die Größe $Z_{\max}^2 t$ den mittleren Fehler $m(Z^2 t) = 2 \mathfrak{B}_{\max} \cdot t \cdot m(Z)$; wobei $m(Z)$ den „mittleren“ Meßfehler der gemessenen maximalen Ordinate Z_{\max} und \mathfrak{B}_{\max} die „wahre“ maximale Ordinate zur Versuchszeit t bedeutet. Da angenommen werden kann, daß $m(Z)$ konstant, d. h. unabhängig ist von Z_{\max} , und da \mathfrak{B}_{\max} mit fortschreitender Versuchszeit wesentlich abnimmt, so nimmt nach obigen Formeln auch der Fehler $m(Z^2)$ mit der Zeit erheblich ab. Der Fehler $m(Z^2 t)$ nimmt dagegen mit der Zeit zu, da $\mathfrak{B}_{\max} t$ bei fortschreitender Versuchszeit wächst.

Als „Gewichte“ hat man die Quadrate der reziproken mittleren Fehler zu nehmen; also erhalten die experimentellen Größen Z_{\max}^2 die Gewichte $1/(\mathfrak{B}_{\max}^2)$ und die experimentellen Größen $Z_{\max}^2 t$ die Gewichte $1/(\mathfrak{B}_{\max}^2 t^2)$ (unter Weglassen unwesentlicher Proportionalitäts-Faktoren).

In die bekannten Ausgleichformeln für die Steigung und den Ordinatenabschnitt einer Geraden sind also für die h -Gerade die Gewichte $1/(\mathfrak{B}_{\max}^2)$ neben

den experimentellen Werten Z^2_{\max} und $1/t$ und für die g -Gerade die Gewichte $1/(\mathfrak{B}^2_{\max} t^2)$ neben den experimentellen Werten $Z^2_{\max} t$ und t einzusetzen. Wie zu erwarten ergibt sich dabei einerseits für die Steigung von h und den Ordinatenabschnitt von g und andererseits für die Steigung von g und den Ordinatenabschnitt von h dieselbe Formel:

Steigung von h = Ordinatenabschnitt von g =

$$\frac{1}{KD} = \frac{\sum \frac{1}{\mathfrak{B}^2 t} \cdot \sum \frac{Z^2}{\mathfrak{B}^2} - \sum \frac{1}{\mathfrak{B}^2} \cdot \sum \frac{Z^2}{\mathfrak{B}^2 t}}{\left(\sum \frac{1}{\mathfrak{B}^2 t}\right)^2 - \sum \frac{1}{\mathfrak{B}^2} \cdot \sum \frac{1}{\mathfrak{B}^2 t^2}}$$

Steigung von g = Ordinatenabschnitt von h =

$$\frac{5 \omega^2 s}{KD} = \frac{\sum \frac{1}{\mathfrak{B}^2 t} \cdot \sum \frac{Z^2}{\mathfrak{B}^2 t} - \sum \frac{1}{\mathfrak{B}^2 t^2} \cdot \sum \frac{Z^2}{\mathfrak{B}^2}}{\left(\sum \frac{1}{\mathfrak{B}^2 t}\right)^2 - \sum \frac{1}{\mathfrak{B}^2} \cdot \sum \frac{1}{\mathfrak{B}^2 t^2}}$$

\mathfrak{B}^2_{\max} bzw. $\mathfrak{B}^2_{\max} t$ sind die den experimentellen Werten Z^2_{\max} bzw. $Z^2_{\max} t$ zeitlich entsprechenden Werte auf der gesuchten Ausgleichgeraden. Da man diese Ausgleichgerade ja aber erst mittels obiger Formeln berechnen muß, setzt man in die Formeln zunächst angenäherte Werte $\approx \mathfrak{B}^2_{\max}$ ein. Diese erhält man dadurch, daß man entweder graphisch oder durch Ausgleich ohne Gewichte eine Gerade durch

die experimentellen Punkte Z^2_{\max} legt. Von der mit diesen ersten Werten $\approx \mathfrak{B}^2_{\max}$ nach obigen Formeln berechneten Ausgleichsgeraden erhält man neue Werte $\approx \mathfrak{B}^2_{\max}$ und wiederholt mit diesen die Ausgleichrechnung. Jeder Schritt dieses „Iterations-Verfahrens“ liefert neue, gegenüber dem vorhergehenden Schritt korrigierte Werte für Steigung und Ordinatenabschnitt. Die Korrekturen werden bei jedem Schritt kleiner. Man setzt das Verfahren solange fort, bis die Korrekturen genügend klein geworden sind. Hier wurden nur zwei solche Schritte durchgeführt.

Die Rechnung lieferte für s/D , s und D sowie für deren mittlere Fehler:

$$\begin{aligned} s/D &= 7,14 \cdot 10^{-7} \pm 1,22 \cdot 10^{-7} \text{ sec}^2/\text{cm}^2 (\pm 17\%), \\ s &= 4,74 \cdot 10^{-13} \pm 0,81 \cdot 10^{-13} \text{ sec} (\pm 17\%) \\ D &= 6,64 \cdot 10^{-7} \pm 0,08 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec} (\pm 1,2\%). \end{aligned}$$

Die Auswertung nach der
Drei-Punkte-Methode
(Tab. 2, Abb. 5 a und 5 b)

In den Gl. (6) und (7) sei:

$$r_2 - r_1 = r_3 - r_2 = \frac{r_3 - r_1}{2} = \Delta r$$

und $(r)^{1/2} \frac{dn}{dr} = W$. Da $\ln(W_2/W_1) = 0,4343 (\log W_2 - \log W_1)$ ist, so gehen Gl. (6) und (7) über in:

$$\frac{s \omega^2}{D} = \frac{(\log W_2 - \log W_1) (r_3 + r_2 - 2 r_0) - (\log W_3 - \log W_2) (r_2 + r_1 - 2 r_0)}{0,4343 r_0 (\Delta r)^2} \tag{12}$$

und

$$e^{s \omega^2 t} = \frac{(\log W_2 - \log W_1) \frac{(r_3 + r_2)}{2} - (\log W_3 - \log W_2) \frac{(r_2 + r_1)}{2}}{r_0 [(\log W_2 - \log W_1) - (\log W_3 - \log W_2)]} \tag{13}$$

Wie weiter vorn bereits dargelegt wurde, darf man für $W = (r)^{1/2} (dn/dr)$ auch direkt einsetzen $W = (r)^{1/2} Z$, wobei Z die dem Gradienten (dn/dr) entsprechende Ordinate der photographierten Gradientenkurve ist und r der Abstand dieses Gradienten vom Rotationszentrum. Die Indexzahlen 1, 2 und 3 bezeichneten hier drei Abstände vom Rotationszentrum zur selben Versuchszeit t , d. h. drei Punkte auf der photographierten Gradientenkurve, die voneinander den gleichen kleinen Abstand $\Delta r'$ haben.

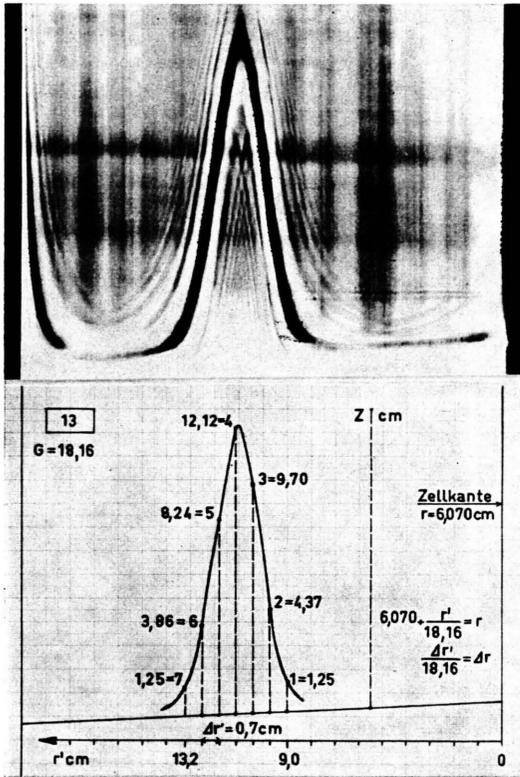
Um s/D und s aus den Gl. (12) und (13) berechnen zu können, braucht man also nur zu irgendeiner Versuchszeit t von drei Punkten auf der Gradientenkurve die r bestimmen und die Z messen. Bestimmt man r und Z von mehr als drei Punkten, so erhält

man auch mehrere Werte für s und s/D aus einer einzigen Gradientenkurven-Aufnahme.

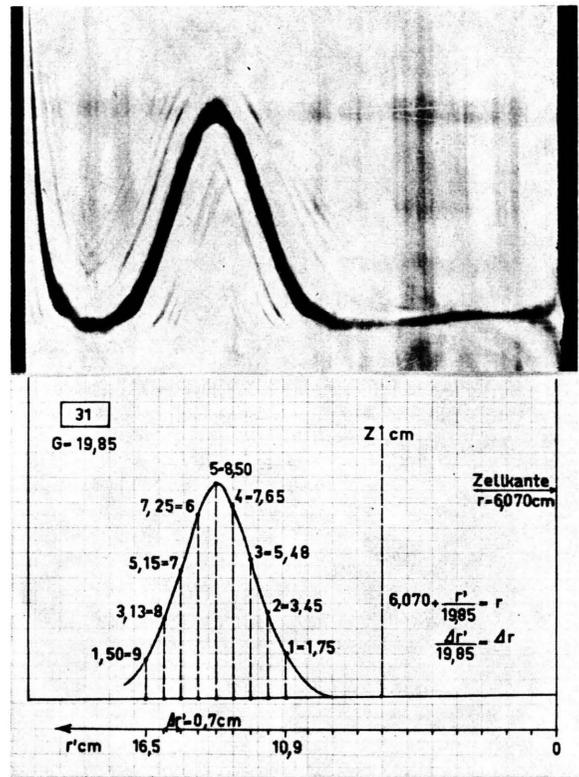
Hier wurden auf diese Weise die vier Gradientenkurven-Aufnahmen Nr. 13 ($t = 2340$ Sek.), Nr. 14 ($t = 2520$ Sek.), Nr. 16 ($t = 2820$ Sek.) und Nr. 31 ($t = 5400$ Sek.) ausgewertet. Bei Nr. 13 und Nr. 14 war die Vergrößerung $G = 18,16$ und bei Nr. 16 und Nr. 31 war $G = 19,85$.

In Tab. 2 und Abb. 5 a und 5 b ist als Beispiel die Auswertung der Kurven Nr. 13 und Nr. 31 gezeigt.

Die Kurven wurden von der Aufnahme auf transparentes mm-Papier durchgepaust, und zwar wurde dabei die innere Trennlinie der Kurve zwischen Dunkel und Hell als maßgebliche Linie angesehen und



a) Aufnahme Nr. 13; $G=18,16$ $t=2340$ Sek.



b) Aufnahme Nr. 31; $G=19,95$ $t=5400$ Sek.

G = Vergrößerung Meßzelle → Aufnahme.

Abb. 5. Auswertung der Aufnahmen Nr. 13 und 31 nach der D.P.M. (s. hierzu Tab. 2).

abgezeichnet. Entsprechend wurde auch die Basislinie der Kurve als Verlängerung des unteren Randes der nichtabgelenkten Phasengrenze gezeichnet.

Die Kurvenfläche wurde dann auf dem mm-Papier parallel zum Bild der oberen Zellkante in Zonen von der Breite $\Delta r' = 0,7$ cm geteilt. Dadurch ergab sich auf der Kurve eine Reihe von Punkten, deren Abstände r' von der oberen Zellkante und deren Ordinaten Z (Abstände bis zur Basislinie der Kurve) gemessen wurden (Spalten 2 und 6 in Tab. 2). Aus r' wurde r berechnet [Gl. (8) $r = (r'/G) + 6,070$ cm]. Darauf folgte die Berechnung von s/D und s nach Gl. (12) und (13), die im einzelnen aus Tab. 2 ersichtlich ist (als r_0 wurde das bei der Svedberg-Methode festgestellte $r_0 = 6,598$ cm eingesetzt. Durch Ausmessen der Aufnahme Nr. 1 ergab sich kein wesentlich anderer Wert).

Die Gl. (12) und (13) enthalten im Zähler Determinanten der Ordnung 2. Eine Determinante der

Ordnung 2 ist z. B.:

$$A = \begin{vmatrix} a & b \\ c & d \end{vmatrix} = ad - cb.$$

Setzt man in den Gl. (12) und (13) an Stelle der speziellen Indezzahlen 1, 2 und 3 für drei ausgewählte Punkte die allgemeinen Indizes $k-1$, k und $k+1$, so gehen Gl. (12) und (13) über in Gl. (12 a) und (13 a):

$$\frac{s \omega^2}{D} = \frac{A_k}{0,4343 r_0 (\Delta r)^2} \quad (12 a)$$

und

$$e^{s\omega^2 t} = \frac{B_k}{r_0 [(\log W_k - \log W_{k-1}) - (\log W_{k+1} - \log W_k)]} \quad (13 a)$$

Hierin sind A_k und B_k die Determinanten:

$$A_k = \begin{vmatrix} (\log W_k - \log W_{k-1}) & (r_k + r_{k-1} - 2r_0) \\ (\log W_{k+1} - \log W_k) & (r_{k+1} + r_k - 2r_0) \end{vmatrix} \quad (12 b)$$

								$\frac{s\omega^2}{D} = \frac{(\Delta \log W)_{2,1}(r_2 + r_2 - 2r_0) - (\Delta \log W)_{2,2}(r_2 + r_1 - 2r_0)}{0,4343 r_0 (\Delta r)^2}$			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Punkt-Nr.	r' [cm]	r'/G [cm]	$r =$ $r_{\text{Zellkante}}$ [cm]	\sqrt{r}	Z [cm]	$W =$ $\sqrt{r \cdot Z}$	$\log W$	$(\Delta \log W)_{k, k-1}$	$r_k + r_{k-1} - 2r_0$	A_k (Gl. 12b)	$\frac{A_k}{0,4343 r_0 (\Delta r)^2 \omega^2} = s/D$
		$r'/18,16 + 6,070$							$r_k + r_{k-1} - 13,196$		$\frac{A_k}{40358}$
	$\Delta r' =$ 0,7	$0,7/18,16 =$		$\Delta r =$ 0,038546						$\cdot 10^2$	$\cdot 10^7$
1.	9,0	0,4956	6,5656	2,5623	1,25	3,2029	0,50555	+ 0,54483	- 0,0263		
2.	9,7		6,6041	2,5698	4,37	11,2300	1,05038	+ 0,34756	+ 0,0508	3,682	9,12
3.	10,4		6,6427	2,5773	9,70	24,9998	1,39794	+ 0,09799	+ 0,1279	3,948	9,78
4.	11,1		6,6812	2,5848	12,12	31,3278	1,49593	- 0,16631	+ 0,2050	4,136	10,25
5.	11,8		6,7198	2,5923	8,24	21,3606	1,32962	- 0,32810	+ 0,2821	2,034	5,04
6.	12,5		6,7583	2,5997	3,86	10,0348	1,00152	- 0,48845	+ 0,3592	1,994	4,94
7.	13,2	0,7269	6,7969	2,6071	1,25	3,2589	0,51307				$7,83 \pm 1,17$
		$r'/19,85 + 6,070$							$r_k + r_{k-1} - 13,196$		$\frac{A_k}{33778}$
	$\Delta r' =$ 0,7	$0,7/19,85 =$		$\Delta r =$ 0,035264						$\cdot 10^2$	$\cdot 10^7$
1.	10,9	0,5491	6,6191	2,5728	1,75	4,5024	0,65345	+ 0,29592	+ 0,0775		
2.	11,6		6,6544	2,5796	3,45	8,8996	0,94937	+ 0,20212	+ 0,1480	2,813	8,33
3.	12,3		6,6896	2,5864	5,48	14,1735	1,15149	+ 0,14603	+ 0,2185	2,255	6,68
4.	13,0		6,7249	2,5933	7,65	19,8387	1,29752	+ 0,04687	+ 0,2891	3,198	9,47
5.	13,7		6,7602	2,6000	8,50	22,1000	1,34439	- 0,06795	+ 0,3596	3,650	10,81
6.	14,4		6,7954	2,6068	7,25	18,8993	1,27644	- 0,14739	+ 0,4301	2,378	7,04
7.	15,1		6,8307	2,6136	5,15	13,4600	1,12905	- 0,12515	+ 0,5006	1,875	5,55
8.	15,8		6,8659	2,6203	3,13	8,2015	0,91390	- 0,31834	+ 0,5711	3,649	10,80
9.	16,5	0,8312	6,9012	2,6270	1,50	3,9405	0,59556				$8,38 \pm 0,78$

Tab. 2. Auswertung der Aufnahmen Nr. 13 und 31 nach der D.P.M.

und

$$B_k = \begin{vmatrix} (\log W_k - \log W_{k-1}) & \frac{(r_k + r_{k-1})}{2} \\ (\log W_{k+1} - \log W_k) & \frac{(r_{k+1} + r_k)}{2} \end{vmatrix} \quad (13 \text{ b})$$

Aus jeweils zwei aufeinander folgenden Reihen der Spalten 9 und 10 in Tab. 2 wurden nach der Gl. (12 b) die Determinanten A_k und aus Spalten 13

und 14 die Determinanten B_k nach der Gl. (13 b) gebildet. Aus den zwei ersten Reihen der Spalten 9 und 10 ergibt sich z. B. die folgende Determinante:

$$A_2 = \begin{vmatrix} +0,54483 & -0,0263 \\ +0,34756 & +0,0508 \end{vmatrix} = (0,54483 \cdot 0,0508) - (0,34756 \cdot -0,0263) = 3,682 \cdot 10^{-2}$$

Jede ausgewertete Gradientenkurven-Aufnahme lieferte auf diese Weise einige Werte für s/D , s und

$$e^{s\omega^2 t} = \frac{(\Delta \log W)_{2,1} \left(\frac{r_2 + r_1}{2} \right) - (\Delta \log W)_{3,2} \left(\frac{r_2 + r_1}{2} \right)}{r_0 [(\Delta \log W)_{2,1} - (\Delta \log W)_{3,2}]}$$

13(=9)	14	15	16	17	18	19	20	21	
$(\Delta \log W)_{k, k-1}$	$\frac{r_k + r_{k-1}}{2}$	B_k (Gl. 13b)	$\frac{(\Delta \log W)_{k, k-1}}{-(\Delta \log W)_{k+1, k}}$	$\frac{B_k}{\text{Sp. 16}} = Q$ $= r_0 \cdot e^{s\omega^2 t}$	Q/r_0 $= e^{s\omega^2 t}$	$\log(Q/r_0) =$ $0,4343 s \omega^2 t$	$\frac{\log(Q/r_0)}{0,4343 \omega^2 t}$ $= s$	$\frac{\text{Spalte 20}}{\text{Spalte 12}}$ $= D$	
					$Q/6,598$	$\log(Q/6,598)$	$\frac{\log(Q/6,598)}{9633 \cdot 10^6}$		
						$\cdot 10^2$	$\cdot 10^{13}$	$\cdot 10^7$	
+ 0,54483	6,5849	1,3200	0,19727	6,6913	1,0141	0,608	6,31	6,92	Aufnahme Nr. 13 $G=18,16$ $t=2340$ Sek. (s. hierzu Abb. 5 a)
+ 0,34756	6,6234	1,6664	0,24957	6,6771	1,0120	0,518	5,38	5,50	
+ 0,09799	6,6620	1,7645	0,26430	6,6761	1,0118	0,509	5,28	5,15	
- 0,16631	6,7005	1,0777	0,16179	6,6611	1,0096	0,415	4,31	8,55	
- 0,32810	6,7391	1,0680	0,16035	6,6604	1,0095	0,411	4,27	8,64	
- 0,48845	6,7776								
							$5,11 \pm 0,38$	$6,95 \pm 0,73$	
					$Q/6,598$	$\log(Q/6,598)$	$\frac{\log(Q/6,598)}{22230 \cdot 10^6}$		
						$\cdot 10^2$	$\cdot 10^{13}$	$\cdot 10^7$	
+ 0,29592	6,6368	0,6329	0,09380	6,7473	1,0226	0,971	4,37	5,25	Aufnahme Nr. 31 $G=19,85$ $t=5400$ Sek. (s. hierzu Abb. 5 b)
+ 0,20212	6,6720	0,3814	0,05609	6,7998	1,0306	1,309	5,89	8,82	
+ 0,14603	6,7073	0,6703	0,09916	6,7598	1,0245	1,051	4,73	4,99	
+ 0,04687	6,7426	0,7758	0,11482	6,7567	1,0241	1,034	4,65	4,30	
- 0,06795	6,7778	0,5360	0,07944	6,7472	1,0226	0,971	4,37	6,21	
- 0,14739	6,8131	0,4565	0,06776	6,7370	1,0211	0,907	4,08	7,35	
- 0,21515	6,8483	0,6991	0,10319	6,7749	1,0268	1,149	5,17	4,79	
- 0,31834	6,8836						$4,75 \pm 0,23$	$5,96 \pm 0,61$	

G = Vergrößerung Meßzelle \rightarrow Aufnahme. $\omega^2 = 9,479 \cdot 10^6$ (29 400 UpM). $r_0 = 6,598$ cm.

D. (Für Aufnahmen Nr. 13 und Nr. 31 s. Tab. 2.)

Da das verwendete Albumin im wesentlichen als einheitlich anzusehen ist, wurde für jede ausgewertete Kurve aus den erhaltenen Einzelwerten ein Mittelwert gebildet.

Diese Mittelwerte und den Gesamtmittelwert aus den 23 Einzelwerten aller vier Kurven zeigt mit den mittleren Fehlern Tab. 3.

Der Vergleich der Werte in Tab. 3 zeigt, daß die Ergebnisse aus den vier ausgewerteten Kurvenaufnahmen in den meisten Fällen nicht mehr voneinander abweichen, als man auf Grund der angegebenen Fehlerbreite erwarten darf. Nur der Wert 4,75 für s von Aufnahme 31 ist etwas kleiner als es nach den berechneten mittleren Fehlern noch erklärbar wäre. Es ist hier zu beachten, daß bei jeder Kurve für

Aufnahme	Nr. 13	Nr. 14	Nr. 16	Nr. 31	Nr. 13, 14, 16, 31
Anzahl der Werte für $s/D-s-D$	5 Daraus Mittelwert	5 Daraus Mittelwert	6 Daraus Mittelwert	7 Daraus Mittelwert	zusammen 23 Daraus Mittelwert
$s/D \cdot 10^7$ sec ² /cm ²	7,83 ± 1,17 (15%) ± 2,62	9,35 ± 0,51 (5,5%) ± 1,14	8,92 ± 0,25 (2,8%) ± 0,62	8,38 ± 0,78 (9,3%) ± 2,07	8,61 ± 0,36 (4,2%) ± 1,74
$s \cdot 10^{13}$ sec	5,11 ± 0,38 (7,4%) ± 0,85	5,65 ± 0,18 (3,2%) ± 0,39	5,66 ± 0,11 (1,9%) ± 0,27	4,75 ± 0,23 (4,8%) ± 0,61	5,26 ± 0,14 (2,7%) ± 0,67
$D \cdot 10^7$ cm ² /sec	6,95 ± 0,73 (11%) ± 1,64	6,11 ± 0,35 (5,7%) ± 0,79	6,37 ± 0,20 (3,1%) ± 0,49	5,96 ± 0,61 (10%) ± 1,62	6,31 ± 0,26 (4,1%) ± 1,23

Tab. 3. Ergebnisse nach der Drei-Punkte-Methode (der zweite mittlere Fehler bei jedem Wert ist der mittlere Fehler des Einzelergebnisses).

Methode	Svedberg-Methode	Maximalgradienten-Methode	Drei-Punkte-Methode
Formel	$\log r_{\max} = 0,4343 s \omega^2 t + \log r_0$	$Z^2_{\max} = \frac{1}{KD} \frac{1}{t} - \frac{5 \omega^2 s}{KD}$	Gl. (12a) u. Gl. (13a)
Auswertung	Aus 27 Aufnahmen: 27 Meßwerte $\log r_{\max}$ gegen t aufgetragen. Ausgleichsgerade	Aus 22 Aufnahmen: 22 Meßwerte Z^2_{\max} gegen $1/t$ aufgetragen. Ausgleichsgerade	Aus 4 Aufnahmen: 23 Werte $s/D-s-D$ Mittelwerte
$s/D \cdot 10^7$ sec ² /cm ²	—	7,14 ± 1,22 (17%)	8,61 ± 0,36 (4,2%) ± 1,74
$s \cdot 10^{13}$ sec	4,75 ± 0,13 (2,7%)	4,74 ± 0,81 (17%)	5,26 ± 0,14 (2,7%) ± 0,67
$D \cdot 10^7$ cm ² /sec	—	6,64 ± 0,08 (1,2%)	6,31 ± 0,26 (4,1%) ± 1,23

Tab. 4. Vergleich zwischen den nach verschiedenen Methoden berechneten Werten von s/D , s und D . Rinderplasmaalbumin, 0,56 g/100 ml in Essigsäure-Natriumacetat-Puffer mit Natriumchlorid, pH 4,4, 21 °C.

sämtliche gemessenen Ordinaten Z dieselbe Basislinie benutzt wird. Wurde die Basislinie bei einer Kurve etwas zu hoch oder zu tief gelegt, so wirkt sich dies auf sämtliche aus der Kurve berechneten Ergebnisse gleichartig aus. Dadurch können zwischen zwei Kurven Differenzen entstehen, die nicht auf den „zufälligen“ Meßfehlern beruhen, die mit dem mittleren Fehler erfaßt werden.

IV. Ergebnis und Diskussion

In Tab. 4 sind die nach den drei Auswertungsmethoden gewonnenen Werte für s/D , s und D sowie ihre berechneten mittleren Fehler zusammengestellt.

Die mittleren Fehler sind ein Maß für die Genauigkeit der angewandten Bestimmungsverfahren (nicht einbegriffen evtl. mögliche „systematische“ Fehler). Ein mittlerer Fehler von z. B. 17% bei der Größe s/D bedeutet, daß der „wahre“ Wert von s/D mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit bis zu 17%

größer oder kleiner sein kann als er gerade bei diesem Versuch gefunden wurde.

Vergleicht man die Werte, die für die Sedimentationskonstante s nach den beiden neuen Methoden erhalten wurden mit dem Wert, der sich nach der klassischen Svedberg-Methode ergab, so sieht man:

Svedberg- und Maximalgradienten-Methode lieferten praktisch denselben Wert für s .

Wenn eine derart gute Übereinstimmung der beiden Werte auch zufällig sein könnte, da die Ungenauigkeit der Verfahren — besonders bei der Mg.M. — wie der mittlere Fehler von s angibt, ziemlich groß ist, so spricht dieses Ergebnis doch dafür, daß die nach den beiden Methoden bestimmten s identische Größen sind, und daß die Formel, deren sich die Mg.M. bedient, richtig ist.

Der nach der Drei-Punkte-Methode erhaltene Wert für s weicht von dem Svedbergschen Wert um etwa 11% nach oben ab.

Diese Differenz ist etwas größer als man sie allein auf Grund der Ungenauigkeit der beiden Verfahren, die durch die mittleren Fehler von s ausgedrückt wird, erwarten dürfte.

Sehr wahrscheinlich sind für diese Abweichung in der Hauptsache systematische Meßfehler bei der D.P.M. beim Abmessen der Kurvenordinaten Z verantwortlich. Solche systematischen, d. h. die Messungen nur immer in derselben Richtung verfälschenden Meßfehler, kamen möglicherweise dadurch zustande, daß die Basislinie bei allen vier nach der D.P.M. ausgewerteten Gradientenkurven zu hoch gelegt worden war und nicht z. B. bei zweien zu hoch und bei zweien zu niedrig. Im letzteren Falle hätte es sich um gewöhnliche, zufällige Fehler gehandelt, die sich weitgehend gegenseitig ausgleichen, wie es bei der größeren Anzahl, nämlich bei den 22, nach der Mg.M. ausgewerteten Kurven anzunehmen ist.

Beim Vergleich der nach der Mg.M. und nach der D.P.M. erhaltenen Werte für s/D und D sieht man:

daß s/D bei der D.P.M. erheblich größer und D etwas kleiner ist als bei der Mg.M.

Falls — wie oben ausgeführt wurde — die Sedimentationskonstante s bei der D.P.M. durch systematische Meßfehler verfälscht wurde, so gilt dies auch in ähnlicher Weise für die Größen s/D und D . Trotzdem liegen die Differenzen der Werte für s/D , s und D zwischen der Mg.M. und der D.P.M. noch innerhalb der Ungenauigkeit beider Verfahren, da dieser Bereich, wie die Betrachtung der mittleren Fehler zeigt, ziemlich groß ist.

Die in Tab. 4 angegebenen mittleren Fehler von s/D , s und D wurden bei der Sv.M. und bei der Mg.M., aus der Streuung der experimentellen Werte $\log r_{\max}$ und Z^2_{\max} um die Ausgleichgeraden berechnet, bei der D.P.M. aus der Streuung der einzelnen Werte für s/D , s und D um ihren Mittelwert.

Der mittlere Fehler der nach Svedberg bestimmten Sedimentationskonstante beträgt $\pm 2,7$ Prozent.

Dies liegt noch im Rahmen der unter gewöhnlichen experimentellen Umständen hierfür üblichen Genauigkeit.

Etwa sechsmal größer ist der mittlere Fehler von s und s/D bei der Mg.M., nämlich ± 17 Prozent.

Der Unterschied kommt im wesentlichen daher, daß die Sedimentationskonstante mit der Meßgröße der Sv. M., r'_{\max} , eben in ganz anderer Weise formelmäßig zusammenhängt als mit der Meßgröße der Mg.M. Z'_{\max} , und nicht etwa daher, daß r'_{\max} und

Z'_{\max} verschieden genau gemessen worden wären (auch die Anzahl der Meßwerte r'_{\max} und Z'_{\max} ist nicht sehr wesentlich verschieden). Vielmehr wurden r'_{\max} und Z'_{\max} mit fast gleicher Genauigkeit bestimmt, wie aus der Streuung der Werte $\log r_{\max}$ und Z^2_{\max} um die Ausgleichgeraden errechnet wurde. Es ergab sich nämlich $\pm 0,036$ cm für den mittleren Fehler von r'_{\max} und $\pm 0,042$ cm für den mittleren Fehler von Z'_{\max} , also fast das Gleiche.

Es dürfte hiernach ganz allgemein so sein, daß man die maximale Ordinate Z'_{\max} (bei der Mg.M.) sehr viel genauer als den Abstand r'_{\max} (bei der Sv.M.) bestimmen muß, um die Sedimentationskonstante s nach der Mg.M. mit derselben Genauigkeit, d. h. mit gleichem mittlerem Fehler zu erhalten wie nach der Sv.M.

Es ist anzunehmen, daß Störungen, wie z. B. Erschütterungen, Temperatur- und Geschwindigkeitschwankungen oder ähnliches während des Versuchs hier nur eine untergeordnete Rolle spielten und daß die Ungenauigkeit der Meßwerte Z'_{\max} und r'_{\max} in erster Linie durch reine Meßfehler verursacht war. Feinere Meßverfahren als sie hier zur Verfügung standen, würden vermutlich die Genauigkeit von Z'_{\max} und r'_{\max} gleicherweise erhöhen. Schärfere Gradientenkurven, bei denen sich auch die Basislinie eindeutiger festlegen läßt, würden vielleicht vorwiegend die Genauigkeit von Z'_{\max} günstig beeinflussen. Es hätten hier die Gradientenkurven durch Verbesserung einiger experimenteller Umstände wohl um einiges schärfer erhalten werden können. Um s und s/D nach der Mg.M. mit befriedigender Genauigkeit bestimmen zu können, müßte man aber vielleicht überhaupt schärfere und eindeutiger Kurven haben, als sie dem Philpot-Svensson-System bisher im allgemeinen eigen sind.

Bei größerer Genauigkeit der Messungen von Z'_{\max} als sie hier erreicht wurde wäre die Streuung der Punkte Z^2_{\max} und $Z^2_{\max} t$ um die Ausgleichgeraden geringer. Dies würde auch bei graphischer Bestimmung von s und s/D zu sichereren Ergebnissen führen, da dann die den Punkten am besten angepaßte Gerade mit dem Auge leichter zu erkennen ist.

Die Genauigkeit, die für s , s/D und D bei der Mg.M. erzielt wird, und die Sicherheit bei der graphischen Bestimmung hängt außer davon, wie genau Z'_{\max} gemessen wurde, auch noch von der Wahl möglichst günstiger Versuchsumstände ab. Allerdings sind die Möglichkeiten hierbei beschränkt.

Gleichbleibende Genauigkeit von Z'_{\max} vorausgesetzt, ergäbe sich zum Beispiel für s/D ein um so geringerer prozentualer mittlerer Fehler, je größer der Ausdruck $(5\omega^2 s)/(KD)$ (d. h. der Ordinatenabschnitt der h -Gerade und die Steigung der g -Gerade) ist.

Darum sollten Versuche mit Philpot-Svensson-Aufnahmen, die nach der Mg.M. ausgewertet werden sollen, bei nicht allzu niedrigen Konzentrationen (je größer Δn_0 , desto kleiner die Konstante K) und bei so hoher Rotorgeschwindigkeit ω wie eben noch möglich, ohne daß dadurch die Sedimentations-Dauer zu kurz wird, durchgeführt werden (bei doppelter Rotorgeschwindigkeit wird der Ordinatenabschnitt der h -Gerade viermal größer).

Im wesentlichen auf Grund des andersartigen formelmäßigen Zusammenhanges mit der Meßgröße Z'_{\max} konnte die Diffusionskonstante D nach der Mg.M., im Gegensatz zu s und s/D , aus denselben Meßwerten Z'_{\max} vergleichsweise

mit recht guter Genauigkeit, nämlich mit einem mittleren Fehler von 1,2 Prozent

erhalten werden, also sogar genauer als die Sedimentationskonstante bei der Sv. M.

Die bisherigen Methoden, D aus Sedimentationskurven zu berechnen, weisen im allgemeinen erheblich größere Fehlerbreiten auf.

Eine mit der Ultrazentrifuge nach der Mg.M. bestimmte Diffusionskonstante muß nicht unbedingt mit der Diffusionskonstante ganz übereinstimmen, die man mit einem Diffusionsgerät erhält. Sehr

wahrscheinlich führen die Partikeln im Zentrifugalfeld der Ultrazentrifuge eine etwas andere Brownsche Bewegung aus als im Diffusionsgerät im Schwerfeld, d. h., daß die Diffusionskonstante in der Zentrifuge eine andere ist als die bei freier Diffusion gemessene. Falls solche Diskrepanzen beobachtet werden, ist für die Bestimmung des Mol.-Gew. nach der Svedberg-Formel die nach der Mg.M. bestimmte Diffusionskonstante aus der Ultrazentrifuge als die richtigere anzusehen, da sie sicher am ehesten die Voraussetzungen, die bei der Ableitung der Svedberg-Formel gemacht wurden, erfüllt.

Ebenso wie bei der Mg.M. ist auch für die Ergebnisse der D.P.M. eine wesentlich größere Genauigkeit zu wünschen als sie hier erreicht wurde. Die mittleren Fehler der Einzelergebnisse bei der D.P.M. sollten nur etwa höchstens 1–3% betragen. Besonders wichtig ist eine solche möglichst große Genauigkeit, wenn festgestellt werden soll, ob die untersuchte Substanz einheitlich oder polydispers ist.

Ebenso wie bei der Mg.M. dürften auch bei der D.P.M. genauere Ergebnisse durch größere Genauigkeit beim Ausmessen der Kurvenordinaten, d. h. durch schärfere Gradientenkurven zu erreichen sein. Auch ein systematischer Fehler infolge einer falsch gelegten Basislinie würde durch größere Schärfe der Kurve eher vermieden werden.

Unseren ganz besonderen Dank möchten wir Herrn Dipl.-Math. JENS KRÜGER aussprechen für die wertvolle Beratung bei der mathematischen Auswertung der experimentellen Ergebnisse.

Weiterentwicklung der manometrischen Methoden (Carbonatgemische)

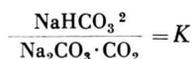
VON OTTO WARBURG UND GÜNTER KRIPPAHL

Aus dem Max-Planck-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem

(Z. Naturforsch. 15 b, 364–367 [1960]; eingegangen am 28. März 1960)

Mit Hilfe neuer Manometriegefäße ist es möglich geworden, die Zellsuspensionen räumlich von den Carbonatgemischen zu trennen und den Druckbereich der CO_2 , den die Gemische konstant halten, auszudehnen auf ein Gebiet von etwa 0,28 bis 600 mm Wasser. Unter den Anwendungen ist eine sehr einfache 1-Gefäß-Methode zur Messung des Quantenbedarfs der Photosynthese besonders hervorzuheben; ferner die Bestimmung des CO_2 -Drucks, der zum Ablauf der Chinon- und Ferricyanidreaktionen in den grünen Grana notwendig ist.

Die Bicarbonat-Carbonatgemische, die durch das Gleichgewicht



den Kohlensäuredruck konstant halten, sind bisher

in der Weise angewendet worden¹, daß die Zellen, z. B. *Chlorella*, in den Gemischen suspendiert wur-

¹ O. WARBURG, Biochem. Z. 100, 230 [1919]; O. WARBURG, H. GELEICK U. K. BRIESE, Z. Naturforsch. 6 b, 285 [1951] und 7 b, 141 [1952].